UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÄNDERUNG DER BLUTGLUCOSEWERTE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER LAGERUNG DER BLUTPROBEN

PETER GROBHOLZ

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0088

AUS DER KLINISCH-EXPERIMENTELLEN ABTEILUNG DER
FORSCHERGRUPPE DIABETES (LEITER:PROF.DR.H.MEHNERT) UND
AUS DER III.MEDIZINISCHEN ABTEILUNG DES STÄDT.KRANKENHAUSES
MÜNCHEN-SCHWABING (CHEFARZT:PROF.DR.H.MEHNERT)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÄNDERUNG DER BLUTGLUCOSEWERTE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER LAGERUNG DER BLUTPROBEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
PETER GROBHOLZ
München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Mehnert
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Seitz
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

I. EINLEITUNG 5

II. UNTERSUCHUNGSGUT und METHODEN

1.Untersuchungsgut 6

2.Methoden 7

a.Vorversuch 7

b.Allgemeine Versuchsanordnung 7

c.Bestimmungsmethoden

1. GOD/POD-Methode 8

2. Hexokinase/G-6-PDH Test 9

3. o-Toluidinmethode 10

d.Statistische Auswertung. 10

III. ERGEBNISSE

1.Vorversuch 12

2.Einfluß der Lagerung nach GOD/POD Test 14

a.Enteiweißung : Uranylacetat. 14

b. " : Perchlorsäure 17

3.Einfluß der Lagerung nach Hexokinase Test. . . . 20

4. " " " " o-Toluidin Test. . . . 23

IV. BESCHREIBUNG und DISKUSSION der ERGEBNISSE 26

V. FOLGERUNG 30

VI. ZUSAMMENFASSUNG. 34

LITERATURVERZEICHNIS 35

Lebenslauf 37

I. E I N L E I T U N G

Obwohl dem Arzt heute mit verschiedenen Schnelltests zur Glucosebestimmung im Blut eine gute Diagnosehilfe gegeben ist,wird er bei Grenzwerten und Verdachtsdiagnosen immer= wieder auf genauere Bestimmungsmethoden zurückgreifen müssen. Stehen ihm dafür nicht die nötigen Apparate zur Verfügung, muß er die Blutproben an ein Labor senden. Möglicherweise werden sie dort erst am nächsten Tag analysiert. Darüber hinaus können es auch andere Umstände erfordern, daß eine sofortige Bestimmung nicht durchgeführt werden kann.
Wichtige Voraussetzung für eine spätere Untersuchung ist, daß sich der ursprüngliche Glucosewerte einer Probe über diesen Zeitraum hinweg nicht wesentlich verändert.
Die Literatur gibt bisher keine konkreten Hinweise auf entsprechende Untersuchungen. DIETZ (3) hält z.B. eine "tage= lange" Aufbewahrung des enteiweißten Überstandes nach Zentrifugation zur späteren Analyse für unbedenklich. BÜRGI u. Mitarbeiter (2) fanden eine Abnahme der Glucosekonzentration ohne vorherige Enteiweißung innerhalb eines Tages um 100 %. HASLBECK (5) ermittelte in einer orientierenden Untersuchung eine Erhöhung des Blutzuckerwertes nach o-Toluidinbestimmung um 5 - 10 % innerhalb von drei Tagen bei enteiweißten, vom Niederschlag abgetrennten Blutproben.
In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, wie sich die Blutglucosewerte, die mit den zur Zeit gebräuchlichsten Bestimmungsmethoden ermittelt wurden, innerhalb von zehn Tagen nach Entnahme ändern.

II. UNTERSUCHUNGSGUT und METHODEN

1. Untersuchungsgut

Von 100 Patienten der III. Med.Abtlg. des Krankenhauses München - Schwabing wurde intravenöses Cubitalvenenblut entnommen. Da sich neben Blutproben von Stoffwechselgesunden auch Proben von Diabetikern befanden, konnte ein breites Spektrum von Glucosewerten zwischen 40 mg% und 430 mg% erfaßt werden. Den Hauptanteil stellen Werte von 80 - 200 mg d.h. es wurde jener Bereich untersucht, der für die Diabetesdiagnose und die Überwachung besonders wichtig ist.

Bereich der Blutglucosewerte in mg%	Anzahl der Blutproben (n)
40 - 60	3
61 - 80	4
81 - 100	19
101 - 120	18
121 - 140	8
141 - 160	11
161 - 180	5
181 - 200	5
201 - 220	8
221 - 240	1
241 - 260	5
261 - 280	2
281 - 300	3
301 - 320	3
321 - 340	3
400 - 430	2

2. M e t h o d e n

a. Vorversuch

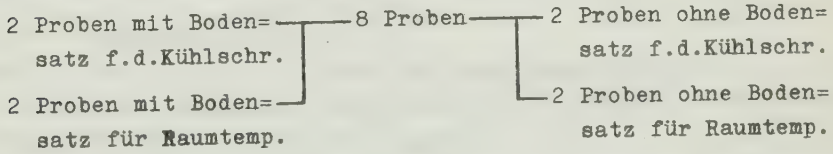
In einer Vorversuchsreihe sollte geklärt werden, inwieweit eine Enteiweißung von Vollblut zur Aufbewahrung einer Probe überhaupt notwendig ist.
Dabei wurde von 12 Blutproben das Serum nach Entnahme abgetrennt und ohne Gerinnungshemmer bei Zimmertemperatur stehengelassen. Eine Enteiweißung mit anschließender Glucosebestimmung von Teilproben des Serums erfolgte alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 120 Minuten. Die Enteiweißung wurde mit 3.6-prozentiger Perchlorsäure durchgeführt. Als Glucosebestimmungsmethoden verwendeten wir sowohl die Hexokinase- als auch die GOD/POD-Methode, auf deren Beschreibung im Abschnitt 2c eingegangen werden soll.

b. Allgemeine Versuchsanordnung

Das Venenblut der Probanden wurde sofort nach Entnahme in drei verschiedene Enteiweißungsmittel im Verhältnis 1:10 einpipettiert und geschüttelt.
Zur Enteiweißung wurde verwendet:

0.16 % Uranylacetat
3.6 % Perchlorsäure
3.0 % Trichloressigsäure

Anschließend wurde jede Probe in acht Teile geteilt und bei 3500 U/min sieben Minuten lang zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes von vier der acht Proben ergab sich dann folgende Aufteilung für die Aufbewahrung, wobei für jeden Wert eine Doppelprobe angesetzt wurde:



Damit konnte dann eine Testreihe über 10 Tage mit folgenden Glucosebestimmungsmethoden begonnen werden:

1. Glucoseoxydase/Peroxydasemethode(GOD/POD)
   a. Enteiweißung: Uranylacetat 0.16 %
   b. " : Perchlorsäure 3.6 %
2. Hexokinase/G-6-PDH Test
   Enteiweißung: Perchlorsäure 3.6 %
3. o-Toluidinmethode
   Enteiweißung: Trichloressigsäure 3.0 %

Mit jeder Probe und jeder Methode erfolgte am Tag der Abnahme sowie am zweiten, fünften und zehnten Tag eine Glucosebestimmung mit Doppelwerten.

c. Bestimmungsmethoden

1. Die Glucoseoxydase/Peroxydasemethode

Als Nachweis dient hier die Oxydation von Glucose zu Gluconsäure durch Glucoseoxydase. Dieser Teil der Reaktion ist spezifisch für Glucose:

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} \text{Gluconsäurelacton} + H_2O_2$$

Das dabei entstehende Wasserstoffperoxyd wird durch Peroxydase in Gegenwart eines Wasserstoffdonators zu Wasser reduziert. Den Wasserstoff gibt das o-Dianisidin ab, das dabei in einen braunroten Farbstoff übergeht. Die Farbentwicklung folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz, d.h. die Farbintensität ist der vorhandenen Glucose direkt proportional Sie kann photometrisch mit dem Filter 436 nm bestimmt werden. Zur Eichung der gewonnenen Werte sollten zusätzlich eine Leer- und zwei Standardproben mitbestimmt werden.

Ansatz: 5 ml Glucosereagenz (Lsg.1,s.u.)
0.5 ml H^+ - Donator (Lsg.2,s.u.)
0.2 ml Probe
35 min Inkubationszeit

Wir verwendeten für unsere Versuchsserie die Originalpackung TC-M der Firma Boehringer Mannheim:

Lösung 1: 0.1 M Phosphatpuffer, pH = 7.0
40 µg POD/ml
250 µg GOD/ml
Lösung 2: 6.6mg o-Dianisidinhydrochlorid/ml

2. Hexokinase - UV -Test

Die Umsetzung der Glucose verläuft bei diesem Ver= fahren über zwei Schritte, die von zwei Enzymen katalysiert werden : Hexokinase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

(1) Glucose + ATP $\xrightarrow{HK}$ Glucose-6-Phosphat + ADP

(2) Gl.-6-P.+NADP $\xrightarrow{G\text{-}6\text{-}PDH}$ 6-Phosphogluconat + NADPH

Meßgröße ist das in Reaktion (2) gebildete NADPH, das bei einer UV-Wellenlänge von 336 nm gemessen wird. Diese Reaktion verläuft stöchiometrisch, sodaß das entstehende NADPH der oxydierten Glucose äquivalent ist.

Der Ansatz erfolgte nach der Originalvorschrift der Boehringer Mannheim Testpackung TC - X :

2.6 ml Puffer (3×10^{-1}M Triäthanolamin, pH = 7.5
4×10^{-3}M Magnesiumsulfat)

0.2 ml Probe

0.1 ml NADP (1.2×10^{-2}M)

0.1 ml ATP (1.6×10^{-2}M)

Nach Durchmischung in der Küvette erfolgte die erste Ablesung der Extinktion E_1 bei 334 nm.Mit einem Plastikspatel wurde anschließend

0.02 ml Hexokinase/G-6-PDH

eingemischt und nach 10 min Inkubation die Extinktion E_2 abgelesen. Der äquivalente Glucosewert ergab sich dann aus der Formel : x (mg% Glucose) = $(E_2 - E_1) \cdot 491.5$

Um technische Bestimmungsfehler über eine so lange Zeitspanne auszuschließen, wurden auch hier jeweils zwei Standardwerte ermittelt.

3. o-Toluidinmethode

Bei diesem Test handelt es sich um eine Furfurol=nachweismethode, bei der im stark sauren Milieu aus Glucose und anderen Aldohexosen Hydroxymethylfurfurol entsteht, das sich mit Phenolen nachweisen läßt. Dazu hat sich o-Toluidin am besten bewährt.

Ansatz und Durchführung:

0.5 ml Probe in
3.0 ml o-Toluidin-Eisessig(95%) 1:10 einpipettieren
8 min im kochenden Wasserbad inkubieren und anschließend abkühlen

Dabei entsteht eine blaugrüne Farbe, deren Extinktion in unseren Versuchen bei 578 nm gemessen wurde.

Alle Messungen wurden mit einem Eppendorf-Photometer durchgeführt.

d. Statistische Auswertung

Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden zunächst alle Glucosekonzentrationen in Prozent umgerechnet, wobei der Wert am Tage der Blutabnahme gleich 100 % gesetzt wurde. Die Änderungen der Konzentrationen nach Lagerung entsprache dann 100 ± x % der Ausgangswerte. Mit diesen Prozentwerten wurden die folgenden Berechnungen durchgeführt.
Aus n=100 Einzelwerten (durch Doppelwerte ermittelt) ließ sich der Mittelwert $\bar{x}$ errechnen:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\sum x_i$ = Summe der Einzelwerte
n = Anzahl der Wert

Daraus konnte die Standardabweichung der Einzelwerte um den Mittelwert S

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

sowie der Standardfehler des Mittelwertes errechnet werden:

$$S.E.M. = \pm \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Zur Ermittlung der Signifikanz der Meßreihen wurde nach dem t-Test (STUDENT-Test) verfahren;d.h. es wurden je zwei Mittelwerte einer Probenreihe in Abhängigkeit ihrer Standard= abweichung und der Probenanzahl miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft.Bei ungleicher Zahl von Proben errechnet sich t nach:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1+n_2-2)}{n_1 + n_2}}$$

Bei einer gleichen Anzahl von Proben vereinfacht sich die Formel auf:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}} \sqrt{n - 1}$$

An Hand einer Tabelle konnte ermittelt werden,daß für unsere Versuchsreihe bei einer Probenzahl von n=100 die Signifikanz= schranken bei $t = \pm 1.975$ liegen;d.h. daß nur jene Werte sich signifikant unterscheiden,deren t-Wert unter -1.975 oder über +1.975 liegt.Dieser t-Wert gilt für eine Irrtumswahr= scheinlichkeit von 5 % bzw. $p = 0.05$.Bei t-Werten innerhalb der oben genannten Schranken wird $p > 0.05$,womit definitions= gemäß eine Signifikanz nicht mehr besteht.Die Tabellen 3,5, 7,9 zeigen die zu den Testreihen gehörigen p-Werte,die sich aus den t-Werten ermitteln ließen.
Bei allen Wertkollektiven wurde vorausgesetzt,daß sie dem Gaußschen Wahrscheinlichkeitsintegral folgen;d.h. daß sie sich aus Werten zusammensetzen,die glockenförmig symmetrisch um einen Mittelwert angeordnet liegen.

III. E R G E B N I S S E

1. V o r v e r s u c h

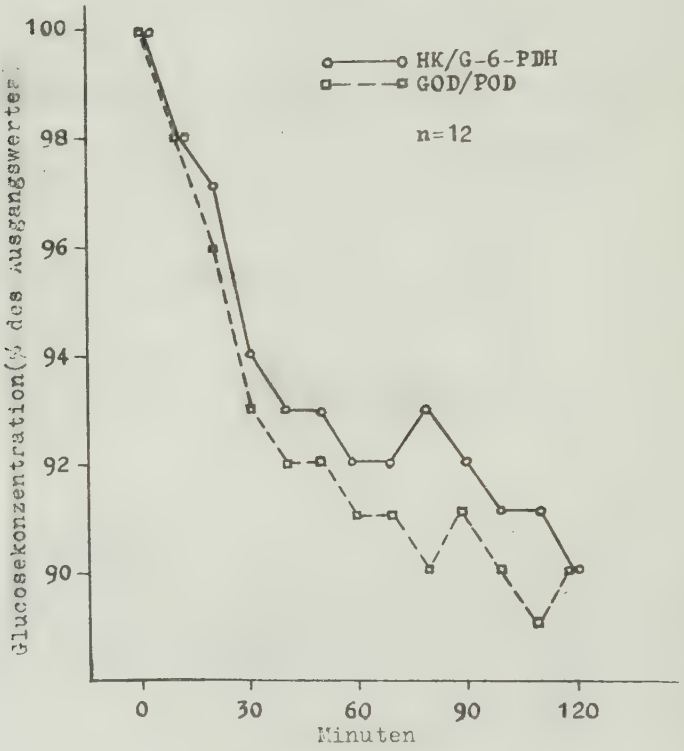


Abb. 1 Änderung der Glucosekonzentration im Serum in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Blutproben
n = Anzahl der untersuchten Proben

Tabelle 1 (Einzelwerte zur Abb. 1)

Untersuchung der Glucosekonzentrationsänderung im Serum in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Blutproben.

Blutglucosebestimmung: - Hexokinase / G-6-PDH
- Glucoseoxydase/Peroxydase

Enteiweißung: Perchlorsäure 3.6 %

Anzahl der Proben : n = 12

Zeitpunkt der Enteiweißung in Minuten	Glucosekonzentration in % des Ausgangswertes -Mittelwerte-	
	HK/G-6-PDH	GOD/POD
0	100	100
10	98	98
20	97	96
30	94	93
40	93	92
50	93	92
60	92	91
70	92	91
80	93	90
90	92	91
100	91	90
110	91	89
120	90	90

2. Glucosebestimmung mit Glucoseoxydase/Peroxydase
   - nach Enteiweißung mit Uranylacetat -

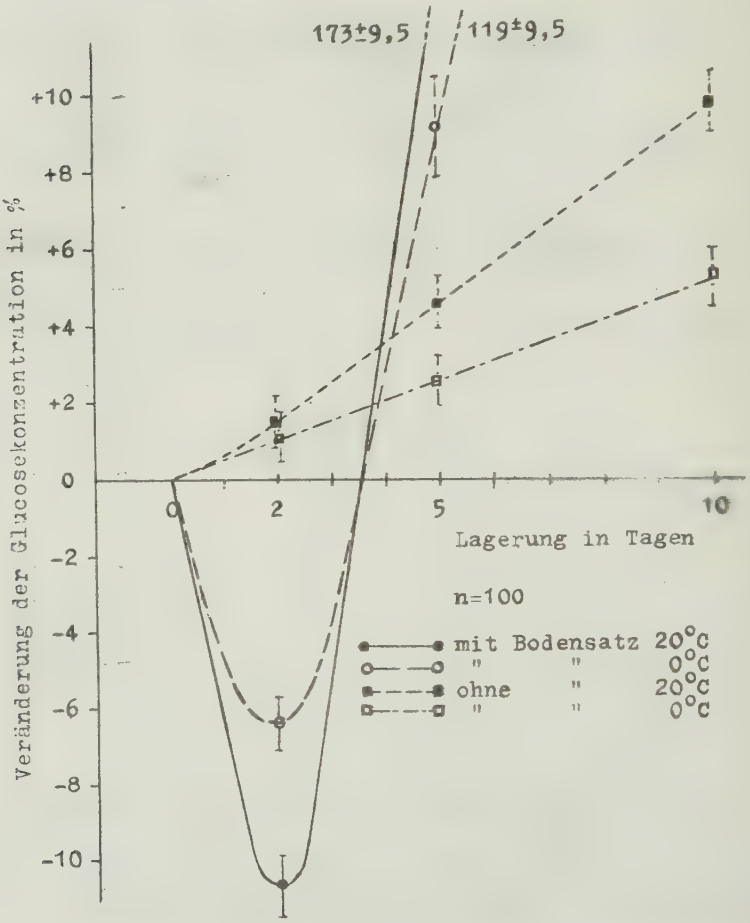


Abb. 2 Änderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben (Mittelwerte ± S.E.M.)
a. Enteiweißung mit 0.16 % Uranylacetat

Lagerung der Proben		Prozentuale Änderung gegen den Ausgangswert von 100 %		Standardabweichung der Einzelwerte	Standardfehler des Mittelwertes
		Mittelwert	Differenz	S	S.E.M.
-mit Bodens. bei 20° C	2 Tg.	89.31	- 10.69	± 8.57	± 0.87
	5 Tg.	153.95	+ 53.95	± 45.70	± 4.82
	10 Tg.	273.14	+173.14	± 89.89	± 9.45
-mit Bodens. bei 0° C	2 Tg.	93.49	- 6.51	± 7.31	± 0.75
	5 Tg.	109.25	+ 9.25	± 12.17	± 1.29
	10 Tg.	219.93	+119.93	± 88.16	± 9.51
-ohne Bodens. bei 20° C	2 Tg.	101.54	+ 1.54	± 6.85	± 0.70
	5 Tg.	104.59	+ 4.59	± 6.49	± 0.68
	10 Tg.	109.81	+ 9.81	± 8.26	± 0.85
-ohne Bodens. bei 0° C	2 Tg.	101.15	+ 1.15	± 7.06	± 0.63
	5 Tg.	102.53	+ 2.53	± 6.25	± 0.65
	10 Tg.	105.25	+ 5.25	± 8.26	± 0.84

Tab. 2 Veränderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben.(Einzelwerte zur Abbildung 2)
Glucosebestimmung mit GOD/POD.Enteiweißung mit Uranylacetat (0.16 %)

Lagerung	Ausgangswert gegen 2.Tg-W.	Ausgangswert gegen 5.Tg-W.	Ausgangswert geg.10.Tg-W.	2.Tag-Wert geg.5.Tg-W.	2.Tag-Wert geg.10.Tg-W	5.Tag-Wert geg.10.Tg-W
-mit Bodens. bei 20° C	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s
-mit Bodens. bei 0° C	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s
- o. Bodens. bei 20° C	$p = 0.023$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.003$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s
- o. Bodens. bei 0° C	$p = 0.12$	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p = 0.15$	$p < 0.001$ s	$p = 0.01$

Tab. 3 Signifikanzwerte enteiweißter Blutproben in Abhängigkeit von der Lagerung
(Einzelwerte zur Abbildung 2)
Glucosebestimmung mit GOD/POD. Enteiweißung mit Uranylacetat (0.16 %)
s = Signifikanter Unterschied zweier Mittelwerte für $p < 0.05$

2. Glucosebestimmung mit Glucoseoxydase/Peroxydase
   - nach Enteiweißung mit Perchlorsäure -

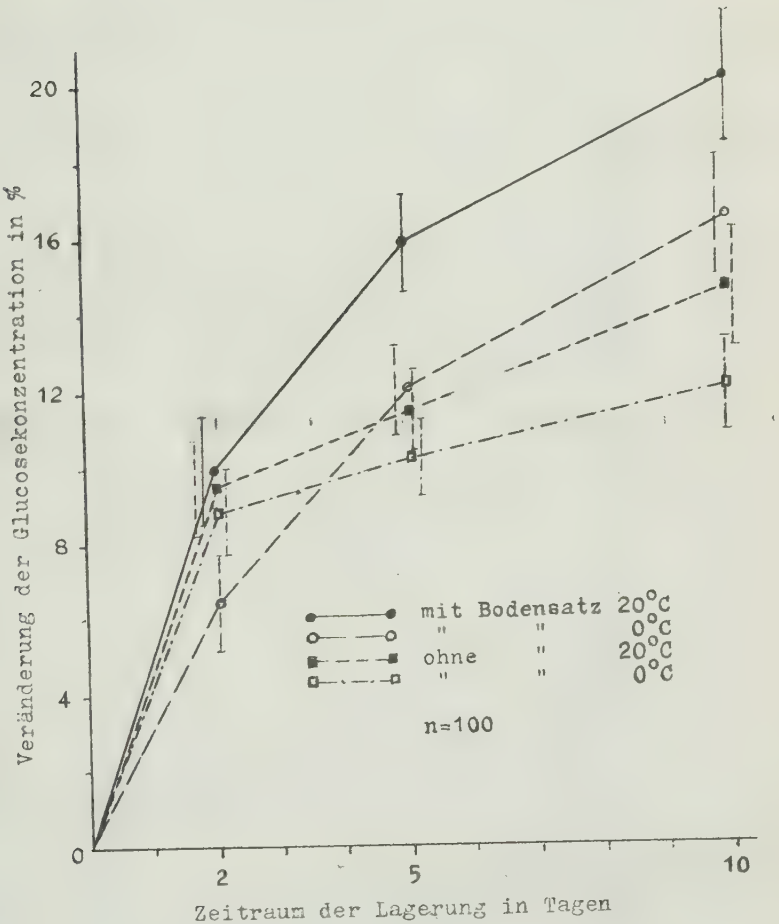


Abb. 3 Änderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben (Mittelwerte ± S.E.M.)
b. Enteiweißung mit 3.6 % Perchlorsäure

Lagerung der Proben		Prozentuale Änderung gegen den Ausgangswert von 100 %		Standardabweichung der Einzelwerte	Standardfehler des Mittelwertes
		Mittelwert	Differenz	S	S.E.M.
- mit Bodens. bei 20° C	2 Tg.	109.97	+ 9.97	± 14.13	± 1.42
	5 Tg.	115.87	+ 15.87	± 12.76	± 1.31
	10 Tg.	120.25	+ 20.25	± 17.00	± 1.73
- mit Bodens. bei 0° C	2 Tg.	106.39	+ 6.39	± 12.67	± 1.28
	5 Tg.	112.01	+ 12.01	± 12.04	± 1.22
	10.Tg.	116.56	+ 16.56	± 15.61	± 1.58
-ohne Bodens. bei 20° C	2 Tg.	109.54	+ 9.54	± 13.18	± 1.33
	5 Tg.	111.46	+ 11.46	± 10.51	± 1.10
	10 Tg.	114.74	+ 14.74	± 15.23	± 1.56
-ohne Bodens. bei 0° C	2 Tg.	108.76	+ 8.76	± 11.67	± 1.18
	5 Tg.	110.24	+ 10.24	± 10.60	± 1.08
	10 Tg.	112.34	+ 12.34	± 12.14	± 1.24

Tab. 4 Veränderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben (Einzelwerte zur Abbildung 3)
Glucosebestimmung mit GOD/POD.Enteiweißung mit Perchlorsäure (3.6 %)

Lagerung	Ausgangswert gegen 2.Tg-W.	Ausgangswert gegen 5.Tg-W.	Ausgangswert geg.10.Tg-W.	2.Tag-Wert geg.5.Tg-W.	2.Tag-Wert geg.10.Tg-W	5.Tag-Wert geg.10.Tg-W
-mit Bodens. bei 2o° C	p<0.001 s	p<0.001 s	p<o.001 s	p=0.003 s	p<0.001 s	p=0.03 s
-mit Bodens. bei 0° C	p<0.001 s	p<0.001 s	p<0.001 s	p=0.002 s	p<0.001 s	p=0.025 s
- o. Bodens. bei 20° C	p<0.001 s	p<0.001 s	p<0.001 s	p=o.25	p<0.01 s	p=0.10
- o. Bodens. bei 0° C	p<0.001 s	p<0.001 s	p<0.001 s	p=0.33	p=0.035 s	p=0.20

Tab. 5 Signifikanzwerte enteiweißter Blutproben in Abhängigkeit von der Lagerung
(Einzelwerte zur Abbildung 3)
Glucosebestimmung mit GOD/POD. Enteiweißung mit Perchlorsäure (3.6%)
s = Signifikanter Unterschied zweier Mittelwerte für p<0.05

3. Glucosebestimmung mit Hexokinase/G-6-PDH

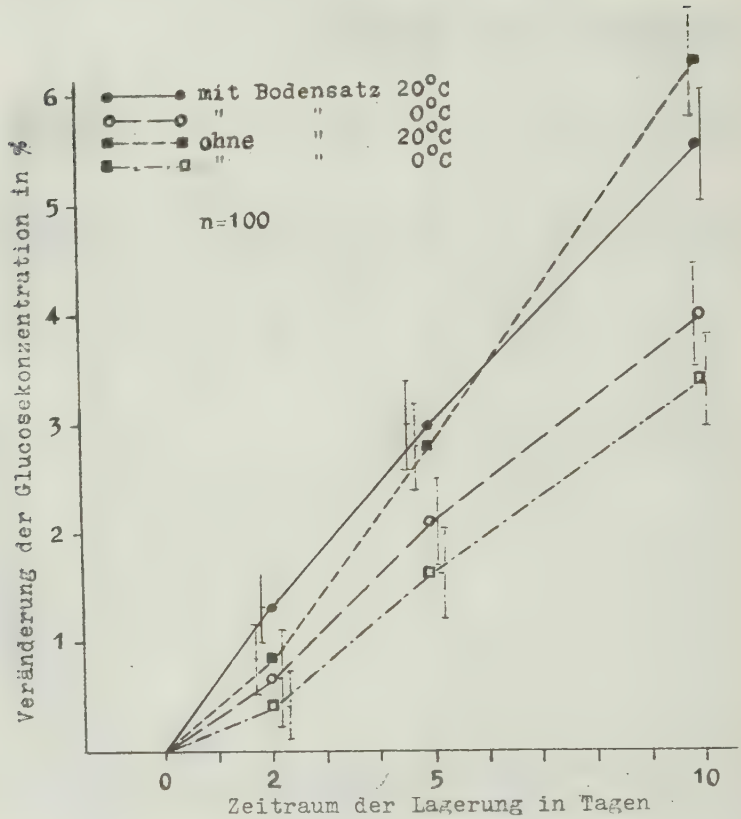


Abb. 4 Änderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben (Mittelwerte ± S.E.M.)
-Enteiweißung mit 3.6 % Perchlorsäure

Lagerung der Proben		Prozentuale Änderung gegen den Ausgangswert von 100 %		Standardabweichung der Einzelwerte	Standardfehler des Mittelwertes
		Mittelwert	Differenz	S	S.E.M.
-mit Bodens. bei 20° C	2 Tg.	101.35	+ 1.35	± 3.22	± 0.33
	5 Tg.	102.30	+ 2.30	± 4.12	± 0.42
	10 Tg.	105.55	+ 5.55	± 5.01	± 0.51
-mit Bodens. bei 0° C	2 Tg.	100.67	+ 0.67	± 4.48	± 0.45
	5 Tg.	101.91	+ 1.91	± 3.93	± 0.39
	10 Tg.	103.94	+ 3.94	± 4.53	± 0.46
-ohne Bodens. bei 20° C	2 Tg.	100.85	+ 0.85	± 3.40	± 0.34
	5 Tg.	102.80	+ 2.80	± 3.92	± 0.40
	10 Tg.	106.35	+ 6.35	± 4.85	± 0.50
-ohne Bodens. bei 0° C	2 Tg.	100.42	+ 0.42	± 3.07	± 0.31
	5 Tg.	101.65	+ 1.65	± 4.10	± 0.42
	10 Tg.	103.41	+ 3.41	± 4.17	± 0.42

Tab. 6 Veränderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben (Einzelwerte zur Abbildung 4)
Glucosebestimmung mit Hexokinase/G-6-PDH. Enteiweißung mit Perchlorsäure (3.6 %)

Lagerung	Ausgangswert gegen 2.Tg-W.	Ausgangswert gegen 5.Tg-W.	Ausgangswert geg.10Tg-W.	2.Tag-Wert geg.5.Tg.W.	2.Tag-Wert geg.10.Tg-W	5.Tag-Wert geg.10.Tg-W
-mit Bodens. bei 20° C	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p = 0.004$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s
-mit Bodens. bei 0° C	$p = 0.15$	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p = 0.035$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s
- o. Bodens. bei 20° C	$p = 0.015$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s
- o. Bodens. bei 0° C	$p = 0.15$	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s	$p = 0.02$ s	$p < 0.001$ s	$p < 0.001$ s

Tab. 7 Signifikanzwerte enteiweißter Blutproben in Abhängigkeit von der Lagerung
(Einzelwerte zur Abbildung 4)
Glucosebestimmung mit Hexokinase/G-6-PDH. Enteiweißung mit Perchlorsäure (3.6 %)
s = Signifikanter Unterschied zweier Mittelwerte für $p < 0.05$

4. Glucosebestimmung mit o - T o l u i d i n

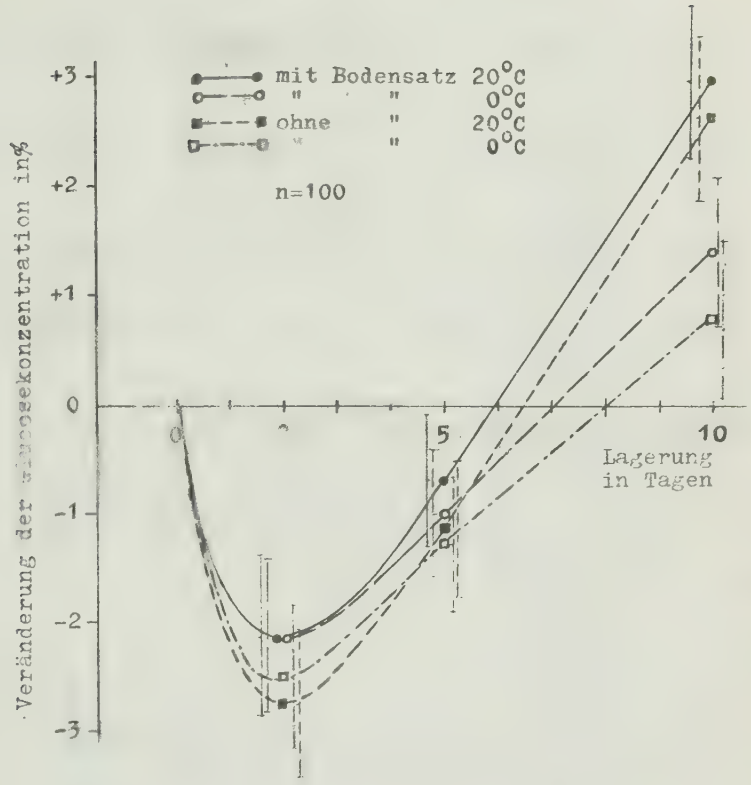


Abb. 5 Änderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben (Mittelwerte ± S.E.M.)
-Enteiweißung mit 3.0 % Trichloressigsäure

Lagerung der Proben		Prozentaule Änderung gegen den Ausgangswert von 100 %		Standardabweichung der Einzelwerte	Standardfehler des Mittelwertes
		Mittelwert	Differenz	S	S.E.M.
- mit Bodens. bei 20° C	2 Tg.	97.86	- 2.14	± 7.36	± 0.74
	5 Tg.	99.32	- 0.68	± 6.05	± 0.61
	10.Tg.	102.96	+ 2.96	± 7.14	± 0.72
- mit Bodens. bei 0° C	2 Tg.	97.85	- 2.15	± 7.03	± 0.71
	5 Tg.	98.91	- 1.09	± 5.77	± 0.58
	10 Tg.	101.41	+ 1.41	± 6.96	± 0.69
-ohne Bodens. bei 20° C	2 Tg.	97.22	- 2.78	± 6.81	± 0.68
	5 Tg.	98.86	- 1.14	± 6.20	± 0.63
	10 Tg.	102.66	+ 2.66	± 7.76	± 0.75
-ohne Bodens. bei 0° C	2 Tg.	97. 49	- 2.51	± 6.55	± 0.66
	5 Tg.	98.73	- 1.27	± 6.23	± 0.63
	10 Tg.	100.79	+ 0.79	± 7.30	± 0.74

Tab. 8 Veränderung der Glucosekonzentration in Prozent des Ausgangswertes durch Lagerung der enteiweißten Blutproben.(Einzelwerte zur Abbildung 5)
Glucosebestimmung mit o-Toluidin. Enteiweißung mit Trichloressigsäure (3.0 %)

Lagerung	Ausgangswert gegen 2.Tg-W.	Ausgangswert gegen 5.Tg-W.	Ausgangswert geg.10.Tg-W.	2.Tag-Wert geg.5.Tg-W.	2.Tag-Wert geg.10.Tg-W	5.Tag-Wert geg.10.Tg-W
-mit Bodens. bei 20° C	p= 0.005 s	p =0.20	p <0.001 s	p= 0.15	p <0.001 s	p <0.001 s
-mit Bodens. bei 0° C	p =0.004 s	p =0.06	p =0.045 s	p =o.28	p <0.001 s	p <0.006 s
- o. Bodens. bei 20° C	p <0.001 s	p =0.02 s	p =0.001 s	p= 0.15	p <0.001 s	p <0.001 s
- o. Bodens. bei 0° C	p <0.001 s	p =0.045 s	p =0.25	p =0.20	p <0.001 s	p =0.025 s

Tab. 9 Signifikanzwerte enteiweißter Blutproben in Abhängigkeit von der Lagerung
(Einzelwerte zur Abbildung 5)
Glucosebestimmung mit o-Toluidin. Enteiweißung mit Trichloressigsäure (3.0 %)
s = Signifikanter Unterschied zweier Mittelwerte für $p < 0.05$

IV. BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Besonders wichtig ist zunächst die Beantwortung der Frage, wie sich die Glucosekonzentration verändert, wenn man entnommenes Blut stehen läßt, da ja die Blutbestandteile, insbesondere die Leukozyten noch stoffwechselaktiv sind. Gemessen mit der Hexokinase/G-6-PDH-Methode nimmt die Glucosekonzentration in den ersten 60 Minuten um 8 % des Ausgangswertes ab und bleibt dann bis 90 Minuten etwa gleich. Innerhalb der nächsten 30 Minuten sinkt sie weiter ab um insgesamt 10 % des Ausgangswertes. Dabei differieren die Werte nach der GOD/POD Methode um etwa 1 % gegenüber dem Glucose-Test, gleichen sich nach 120 Minuten jedoch wieder völlig an die Werte der Hexokinasemethode an.
Diese Veränderungen sind wichtig für die Bewertung von Stoffwechseluntersuchungen, bei denen Blutglucosebestimmungen durchgeführt werden. Enteiweißt man z.B. alle Proben nach einer zweistündigen Testreihe gleichzeitig, so ist die Blutglucosekonzentration zu Beginn der abgenommenen Proben um etwa 10 % zu niedrig, die zuletzt abgenommene jedoch noch unverändert. Die Werte dieser Versuchsreihe sind niedriger als die Werte von BÜRGI (2), der eine Konzentrationsabnahme von 20 % innerhalb von zwei Stunden ermittelte.
In diesem Zusammenhang untersuchten FÖRSTER u. HASLBECK (4) das Verhalten der Lactatkonzentration während der Inkubation von frischem Rattenblut und von gewaschenen Rindererythrozyten nach Zugabe von Glucose. Sie stellten fest, daß nach einer Inkubation von drei Stunden die Lactatkonzentration im Vollblut um das Dreifache des Ausgangswertes anstieg, während in der gleichen Zeit die Glucosekonzentration durch die Erythrozyten nicht zugunsten der Lactatkonzentration verändert werden konnte. Dieser Versuch erhärtet die Annahme, daß auch in vitro eine Änderung der Glucosekonzentration durch die proteingebundenen Enzyme stattfindet.
Nach diesen Ergebnissen muß gefordert werden, daß eine Blut-

probe sofort nach Entnahme enteiweißt wird, wenn genaue Werte bei einer späteren Glucosebestimmung erhalten werden sollen.

Wie weit gehen jedoch die Veränderungen der Glucosewerte bei einer späteren Bestimmung ?

Wird die Glucosekonzentration einer Probe mit Glucoseoxydase/ Peroxydase ermittelt und zuvor mit Uranylacetat enteiweißt, so ergeben sich dann extreme Veränderungen, wenn der Bodensatz nach Zentrifugation in der Probe belassen wird: Nach zwei Tagen sinkt die Glucosekonzentration zunächst um etwa 6% bei 0° C Lagerung bzw. um 10 % bei 20° C Lagerung ab und steigt daraufhin innerhalb von 10 Tagen auf + 119 % bzw.+173 % des Ausgangswertes an. Diese Extinktionserhöhung gibt keine Glucosewerte wieder, sondern ist vor allem auf die Hämolyse zurückzuführen, die im Bodensatz auftritt. Darauf hat schon BERNDT (1) hingewiesen und Erhöhungen um 40 % des Ausgangswertes nach wenigen Tagen Lagerung gemessen. Durch die verschiedene Dichte des Hämolysates im Reagenzglas, die bereits durch geringfügige Bewegung verursacht wird, ergeben sich sehr hohe Streuwerte.

Die relative Abnahme der Extinktion in den ersten drei Tagen um bis zu 10 % kann bisher nicht erklärt werden. Bei Lagerung des Überstandes ohne Bodensatz treten diese Veränderungen nicht auf. Es ergeben sich lediglich Zunahmen der Konzentration um 5 % im Kühlschrank und um 10 % bei Raumtemperatur in annähernd linearem Anstieg.

Ein signifikanter Unterschied ist für fast alle Werte gewährleistet. Lediglich der 2-Tageswert nach Lagerung ohne Bodensatz bei 0° C unterscheidet sich nicht signifikant sowohl vom Ausgangswert als auch vom 5-Tageswert.

Andere Ergebnisse zeigt eine Enteiweißung mit Perchlorsäure bei gleicher Bestimmungsmethode. Dabei steigen die Glucosekonzentrationen sofort an und zwar bei belassenem Bodensatz und 20° C Lagerung um + 10 % nach zwei Tagen, um +16% nach fünf und um +20 % nach 10 Tagen. Für 0°C Lagerung betragen die

Werte: + 6 %, + 12 % und + 16 %.
Die Werte ohne Bodensatz steigen zunächst schnell auf + 9% innerhalb der ersten zwei Tage an und erhöhen sich dann langsam bis auf +15 % nach 10 Tagen bei 20° C und auf +12 % bei 0° Lagerung.
Abgesehen von der unspezifischen Streuung in der vorangegangenen Reihe, liegen hier die insgesamt höchsten Streubreiten vor. Trotzdem sind - bedingt durch die großen Abstände - die meisten Werte signifikant verschieden. Nicht signifikant unterscheiden sich die Werte nach Lagerung ohne Bodensatz vom zweiten und fünften, sowie vom fünften und zehnten Tag.
Interessant dürfte bei dieser Reihe sein, daß die Werte in ihrer Entwicklung mehr einer logarithmischen Funktion folgen, die einen Endwert der Extinktionserhöhung anstrebt.
Im Vergleich mit den anderen Versuchsreihen liegen hier die höchsten Veränderungen der Ausgangswerte vor - ausgenommen die unspezifische Extinktionserhöhung der GOD - Uranylacetat Bodensatzreihe.
Dieses Ergebnis gibt BERNDT (1) recht, wenn er empfiehlt, daß auch nach Perchlorsäureenteiweißung der Überstand sofort abgetrennt werden sollte.
Obgleich bei der Hexokinasemethode ebenso mit Perchlorsäure enteiweißt wurde, ist die Extinktionszunahme doch nicht so groß wie bei der GOD/POD Methode. Innerhalb von zwei Tagen steigen die Konzentrationen mit Bodensatz auf +1.4 % bei 20° C bzw. +0.7 % bei 0° C Lagerung und erreichen in annähernd gleichmäßigem Anstieg nach zehn Tagen Werte um +5.3 % bei 20° C und um +4.0 % bei 0° C. Die Konzentrationen ohne Bodensatz nehmen nach zwei Tagen um +0.9 % bei 20° C und um +0.5 % bei 0° C Lagerung zu. Nach zehn Tagen haben sich die Werte auf +6.2 % bzw. +3.3 % erhöht.
Die geringe Streubreite läßt eine zuverlässige Interpretation der Geraden zu. Außerdem unterscheiden sich fast alle Werte signifikant voneinander. Nur bei den beiden 2-Tageswerten

nach Lagerung bei 0° C liegt keine Signifikanz gegenüber dem Ausgangswert vor.
Dieses Ergebnis ist insofern erfreulich, als der Glucose-UV-Test im Routinelabor immer mehr Beachtung findet und somit auch in dieser Fragestellung seine gute Brauchbarkeit beweist.

Bei der o-Toluidinmethode führt eine Lagerung über zehn Tage nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure insgesamt zur geringsten Extinktionszunahme. Dabei sinken zunächst alle Glucosekonzentrationen bis zum zweiten Tag auf Werte zwischen - 2.2 % und - 2.8 % des Ausgangswertes. Am fünften Tag werden in einem Anstieg Werte von -0.7 % bis -1.4 % erreicht. Bis zum zehnten Tag steigen die Konzentrationen linear in den positiven Bereich und bilden Werte von +2.6 % ohne Bodensatz und +2.8 % mit Bodensatz bei 20° C Lagerung, sowie +0.8 % ohne Bodensatz und +1.3 % mit Bodensatz bei 0° C Lagerung. Dabei tritt die gleiche Situation ein wie bei der GOD/POD-Methode nach Uranylacetatenteiweißung. Allerdings steht die anfängliche Extinktionsabnahme dort im Zusammenhang mit der Belassung des Bodensatzes, während sie hier in allen vier Reihen (mit und ohne Bodensatz) zu beobachten ist. Außerdem ist die Differenz zum Ausgangswert nur ein Viertel des bei der GOD/POD Methode gemessenen Wertes.
Die Streubreiten dieser Reihen liegen z.T. höher als bei den anderen Versuchsreihen. Dadurch, und durch die geringeren Differenzen zum Ausgangswert lassen sich hier die geringsten statistischen Unterschiede im Vergleich zu den anderen Testreihen feststellen. So zeigen sämtliche Werte der 5-Tagesreihe keine signifikanten Unterschiede gegenüber der 2-Tagesreihe. Dasselbe gilt für die Werte des fünften Tages im Vergleich zu den Werten am Tag der Abnahme nach Lagerung mit Bodensatz.

V. F O L G E R U N G

Insbesondere für die Praxis ergeben sich aus den vorliegenden Untersuchungen wichtige Folgerungen. Obwohl in den meisten Arztpraxen heute ein Photometer bereit steht, ist es oftmals aus Zeitmangel oder auf Grund von eingeführten "Labortagen", an denen eine entsprechend ausgebildete medizinisch-technische Assistentin zur Verfügung steht, nicht möglich, Blutglucosebestimmungen am selben Tag auszuwerten.
Es ist für die Einstellung des ambulant behandelten Diabetikers vom therapeutischen Gesichtspunkt aus von weniger entscheidender Bedeutung, ob der Blutglucosewert z.B. 180, 190 oder 200 mg% beträgt. In keinem Falle würde daraus eine Änderung der Insulin- bzw. der Tablettendosis resultieren. Trotzdem ist es für den behandelnden Arzt unbedingt notwendig neben den bekannten Fehlerquellen einer Laboruntersuchung auch die Fehlermöglichkeiten, die sich aus der Lagerung von Blutproben ergeben, zu kennen und sie in die Interpretation eines Blutglucosewertes mit einzubeziehen.
Von entscheidender Bedeutung ist jedoch die Bestimmung der "wahren Glucose" für die Diabetesdiagnostik. So ist es z.B. durchaus nicht gleichgültig, ob bei einem oralen Glucosetoleranztest der Zweistundenwert nach Gabe von 100 gr Glucose 120, 130 oder 140 mg% beträgt. Daraus könnte bereits eine schwerwiegende Fehldiagnose resultieren. Auf Grund der angegebenen Blutglucosewerte wären drei Diagnosen möglich; nämlich die einer normalen Glucosetoleranz, eines fraglich latenten Diabetes mellitus sowie eines latenten Diabetes mellitus. Ebenso könnte natürlich auch zu irgend einem anderen Zeitpunkt der Belastung ein Blutglucosewert z.B. von 160, 170 oder 180 mg% falsch beurteilt werden. Beim intravenösen Tolbutamidtest, bei dem im Gegensatz zum oralen Glucosetoleranztest die Blutglucosewerte in Abhängigkeit vom Ausgangswert prozentual beurteilt werden, wäre eine Erhöhung

oder eine Erniedrigung der Blutglucosewerte durch eine längere Lagerung nicht so gravierend, da bei gleicher Behandlung der Blutproben in jedem Fall das prozentuale Verhältnis gleichbleiben würde. Jedoch können auch hier bereits erhöhte Blutglucosenüchternwerte über 100 mg% Anlaß zu einer Fehlinterpretation des Tests geben.
Aus praktischer Sicht müssen also folgende wichtige Fragen diskutiert und beantwortet werden :

1. Wie müssen frisch entnommene Blutproben weiterbehandelt und gelagert werden ?
2. Welches Enteiweißungsmittel und welche Methode zur Bestimmung der Blutglucose ist bei längerer Lagerung am zweckmäßigsten ?
3. Mit welchem Fehler muß bei der jeweiligen Blutglucose=bestimmung nach einem bzw. mehreren Tagen Lagerung gerechnet werden ?

Zur Frage 1 :

Grundsätzlich läßt sich zur Frage nach einer genauen Glucosebestimmung nach längerer Lagerung feststellen, daß eine Aufbewahrung von Blutproben über einen Tag hinaus möglich ist, soweit verschiedene Bedingungen erfüllt werden. Dazu gehört in jedem Fall die sofortige Enteiweißung nach Blutentnahme. Eine anschließende Zentrifugation ist nicht unbedingt erforderlich, wenn mit Perchlorsäure oder Trichlor=essigsäure enteiweißt wurde und die Aufbewahrung der Proben sich nicht über mehr als drei Tage erstreckt. Nach Uranyl=acetatenteiweißung muß jedoch sofort zentrifugiert und der Überstand vom Bodensatz abgetrennt werden. Außerdem ist darauf zu achten, daß zuvor beim Pipettieren der Probe kein Blut an der Gefäßwand über dem Flüssigkeitsspiegel anhaftet, damit eine spätere Hämolyse und Einfärbung der Probe ver=mieden wird. Aber auch bei Perchlorsäureenteiweißung werden besonders bei längerer Lagerung bessere Werte erzielt , wenn im Anschluß an die Enteiweißung zentrifugiert wird.

Der Einfluß der Temperatur ist in den ersten zwei Tagen der Lagerung noch zu gering um wesentliche Abweichungen vom Ausgangswert herbeiführen zu können. Trotzdem sollte eine längere Wärmeexposition der Proben - etwa durch Sonne oder Heizung - vermieden werden. Für die Aufbewahrung der Proben über mehrere Tage hinaus empfiehlt es sich, die Proben im Kühlschrank zu lagern. Daß die Blutproben während der Lagerung immer fest verschlossen sein müssen,um Verdunstungsfehler zu vermeiden, ist fast selbstverständlich und soll hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Zur Frage 2 :

Wie bereits erwähnt, eignen sich zur Enteiweißung sowohl Perchlorsäure als auch Uranylacetat, wenn dabei obengenannte Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Nach Enteiweißung mit Perchlorsäure lassen sich die besten Ergebnisse im Sinne einer Konstanz der Blutglucosewerte erzielen , wenn die Bestimmung mit Hexokinase/G-6-PDH durchgeführt wird. Diese Methode läßt außerdem die geringsten Streuwerte erwarten. Die Glucoseoxydase/Peroxydase Methode sollte nach Perchlorsäureenteiweißung nicht verwendet werden, da die Abweichungen bereits nach einem Tag Lagerung ein Mehrfaches der Werte des Glucose-UV-Tests betragen. Sollte trotzdem in einem Labor nur mit GOD/POD gearbeitet werden, läßt sich eine Enteiweißung mit Uranylacetat und anschließender Zentrifugation empfehlen. Danach liegen die Abweichungen nur wenig über den mit Hexokinase bestimmten Werten.

In Fällen, wo keine der beiden enzymatischen Bestimmungsmethoden Verwendung findet, kann auf die o-Toluidinmethode nach Trichloressigsäureenteiweißung zurückgegriffen werden. Allerdings sind dabei die Streubreiten größer als bei den vorher genannten Methoden, sodaß nur noch bedingt von einer exakten Wiedergabe der ursprünglichen Glucosewerte gesprochen werden kann.

Zur Frage 3 :

Legt man einen Zeitraum bis zu fünf Tagen Lagerung der Proben (sofortige Enteiweißung, Zentrifugation mit Abtrennung des Überstandes, Aufbewahrung im Kühlschrank) zugrunde, so muß mit folgenden prozentualen Veränderungen der Ausgangswerte gerechnet werden :

Nach Bestimmung der Glucose mit Glucoseoxydase/Peroxydase und Uranylacetatenteiweißung steigen die Werte am ersten Tag um 1 % und innerhalb weiterer vier Tage um bis zu 5 % der ursprünglichen Werte an.

Die nach Perchlorsäureenteiweißung und mit der Hexokinasemethode ermittelten Werte verändern sich einen Tag nach Entnahme um +0.5 % und erreichen am fünften Tag eine Zunahme um + 3 % der Ausgangswerte.

Wird die Blutglucose mit o-Toluidin gemessen (nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure), so lassen sich folgende Veränderungen feststellen : Ein Tag nach Entnahme Abfall der Blutglucosewerte um etwa 2 %; nach zwei Tagen Abnahme um etwa 3 % und nach fünf Tagen wieder ein leichter Anstieg auf - 1 % der Ausgangswerte.

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

Bei 100 Stoffwechselgesunden und Diabetikern wurden venöse Blutproben untersucht. Die Blutglucosewerte lagen dabei in einem Bereich von 40 - 420 mg%. Sofort nach der Blutentnahme wurden die Proben enteiweißt, zentrifugiert und teilweise vom Bodensatz abgetrennt. Am gleichen Tag, sowie nach zwei, fünf und zehn Tagen Aufbewahrung der Proben im Kühlschrank und bei Raumtemperatur wurden die Glucosewerte mit drei verschiedenen Methoden bestimmt.

Dabei ergaben in allen Fällen die Proben mit Bodensatz im Vergleich zu den Proben ohne Bodensatz die höheren Werte. Ebenso verhielten sich die Werte der Blutproben, welche bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden gegenüber jenen Werten, welche nach Lagerung im Kühlschrank gemessen wurden. Abgesehen von den Proben, die nach Uranylacetatenteiweißung mit Bodensatz aufbewahrt wurden und durch Hämolyse zu extrem hohen Werten anstiegen, ließ sich nach 10 Tagen Lagerung die größte Extinktionszunahme von 20 % bei der Glucoseoxydase/Peroxydase-Methode nach Enteiweißung mit Perchlorsäure feststellen. Bis zu 10 % stiegen die Werte nach dem GOD/POD-Test mit Uranylacetatenteiweißung bei 10 Tagen Lagerung ohne Bodensatz an. Ein geringerer Anstieg zeigte sich bei der Glucosebestimmung mit Hexokinase/G-6-PDH und Perchlorsäureenteiweißung (Maximal 6 % nach 10 Tagen Lagerung). Die niedrigsten, jedoch stärker streuenden Werte ergab die Bestimmung mit o-Toluidin und Trichloressigsäureenteiweißung (+3 % nach 10 Tagen).

Die Frage, ob genaue Bestimmungen der Blutglucose auch nach 1 - 2 Tagen durchführbar sind, läßt sich nach diesen Ergebnissen für folgende Bestimmungsmethoden bejahen, da hier nur Abweichungen im Sinne einer Erhöhung der Blutglucosekonzentration um maximal 2 % auftreten :

1. GOD/POD Methode
   Enteiweißung: Uranylacetat 0.16 %
2. Hexokinase/G-6-PDH Methode
   Enteiweißung: Perchlorsäure 3.6 %

-Lagerung ohne Bodensatz-

LITERATURVERZEICHNIS

1. BERNDT, E. u. DELBRÜCK, A.
Glucosebestimmungsmethoden
Ärztliches Laboratorium 11, 476 (1967)

2. BÜRGI, W. u. RICHTERICH, R.
Die Glucosekonzentration im kapillären und venösen Plasma bei direkter enzymatischer Bestimmung
Schweizer Med. Wschr. 97, 1721 (1967)

3. DIETZ, E.
Neue Methoden zur Blutzuckerbestimmung
Arbeitsmed., Sozialmed., Arbeitshygiene
3, 84 (1968)

4. FÖRSTER, H. u. HASLBECK, M.
diagnostik (im Druck)

5. HASLBECK, M. u. MEHNERT, H.
Darf enteiweißtes Blut zur Zuckerbestimmung aufbewahrt werden ?
Med. Klinik 4, 184 (1970)

Herrn Prof. Dr. H. Mehnert danke ich sowohl für die Überlassung des Themas als auch dafür, daß ich in seiner Klinik arbeiten durfte.
Herrn Oberarzt Dr. Haslbeck und Herrn Priv. Doz. Dr. Förster möchte ich für ihre Ratschläge und ihre Hilfe bei der Abfassung der Arbeit danken.

LEBENSLAUF

Am 19. September 1944 wurde ich als 3. Kind des Behördenangestellten Fritz Grobholz und seiner Ehefrau Mathilde, geb. Haggenmiller in Marktredwitz geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Wunsiedel von 1950 - 1955 trat ich im Herbst 1955 in die Oberrealschule Wunsiedel ein. Anläßlich eines Wohnungswechsels nach München setzte ich 1958 meine Ausbildung in der Gisela-Oberrealschule fort und legte dort im Juni 1965 die Reifeprüfung ab.

Nach einjähriger Militärzeit in einer Sanitätseinheit immatrikulierte ich mich im Wintersemester 1966 an der Universität München für das Studium der Medizin. Im Mai 1968 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im März 1969 die ärztliche Vorprüfung ab. Die ärztliche Prüfung beendete ich am 12.6.1972.